

Luminal型与Basal-like型乳腺癌差异 miRNAs 的表达与预后分析



赵明娟¹, 刘江波², 袁芊芊³, 邓 通¹, 黄 桥¹, 吴高松³, 方 程¹

1. 武汉大学中南医院循证与转化医学中心 (武汉 430071)
2. 河南科技大学第一附属医院甲状腺乳腺肿瘤外科 (河南洛阳 471000)
3. 武汉大学中南医院甲状腺乳腺外科 (武汉 430071)

【摘要】目的 分析 Luminal 型和 Basal-like 型乳腺癌之间差异表达的 microRNAs (miRNAs), 并探讨其表达水平与 Luminal 型和 Basal-like 型乳腺癌预后的关系。**方法** 从基因表达综合数据库 (GEO) 中下载包含 Luminal 和 Basal-like 乳腺癌患者相关的 miRNAs 微阵列数据集 GSE81000 与 GSE40267, 利用 GEO2R 在线分析工具筛选 Luminal 和 Basal-like 乳腺癌之间差异表达的 miRNAs, 再通过 mirDIP 数据库预测其靶基因, 并采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 在人乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-468 中验证 miRNAs 的差异表达。最后利用 METABRIC 数据库, 采用 Kaplan-Meier Plotter 在线工具分析 miR-199a-5p 和 miR-199b-5p 表达水平与 Luminal 型和 Basal-like 型乳腺癌预后的关系。**结果** 筛选出了 35 种在 Luminal 型和 Basal-like 型乳腺癌中差异表达的 miRNAs。相较于 Luminal 型, 18 种 miRNAs 在 Basal-like 型中表达下调, 17 种表达上调。靶基因预测结果显示, 35 种差异表达 miRNAs 的潜在靶基因共 4 180 个, 其中最相关的靶基因有 19 个, 且其对应的差异 miRNAs 为: miR-199a-5p、miR-199b-5p。相较于 Luminal 型乳腺癌, miR-199a-5p 和 miR-199b-5p 在 Basal-like 型乳腺癌中表达下调。qRT-PCR 检测结果表明, miR-199a-5p 和 miR-199b-5p 在 MCF-7 (Luminal 型) 和 MDA-MB-468 (Basal-like 型) 细胞中的表达水平与 GEO2R 分析结果趋势一致。生存分析结果表明, miR-199a-5p 与 miR-199b-5p 低表达与 Luminal A 型乳腺癌患者的总生存率降低显著相关。**结论** 共筛选出 35 个在 Luminal 型和 Basal-like 型乳腺癌中差异表达的 miRNAs。其中, miR-199a-5p、miR-199b-5p 与乳腺癌的预后相关, 有望成为其治疗的新靶点。

【关键词】 miRNAs; Luminal 型乳腺癌; Basal-like 型乳腺癌; 生存分析

Differentially expressed miRNAs in Luminal and Basal-like breast cancer

Ming-Juan ZHAO¹, Jiang-Bo LIU², Qian-Qian YUAN³, Tong DENG¹, Qiao HUANG¹, Gao-Song WU³, Cheng FANG¹

1. Center for Evidence-Based and Translational Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202101059

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (2042019kf0173)

通信作者: 吴高松, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: wugaosongtj@163.com

方程, 博士, 助理研究员, E-mail: vitsippa@whu.edu.cn.

2. Department of Thyroid and Breast Ontological Surgery, First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, Henan Province, China

3. Department of Thyroid and Breast Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: Gao-Song WU, E-mail: wugaosongtj@163.com; Cheng FANG, E-mail: vitsippa@whu.edu.cn

【Abstract】Objective To analysis differences in differentially expressed microRNAs (miRNAs) between luminal and basal-like breast cancer, and to explore the relationship between the expression level and the prognosis of luminal and basal-like breast cancer. **Methods** The miRNAs microarray datasets GSE81000 and GSE40267 which included the luminal and basal-like breast cancer patients were downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO). The GEO2R analysis tool was used to screen differentially expressed miRNAs in luminal and basal-like breast cancer patients. The target genes of differentially expressed miRNAs were predicted by mirDIP database. The differential expression miRNAs verification was performed on human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-468 using quantitative real-time PCR. Finally, the relationship between the expression levels of miR-199a-5p and miR-199b-5p and the prognosis of luminal and basal-like breast cancer was analyzed by Kaplan Meier plotter online survival analysis. **Results** There were a total of 35 differentially expressed miRNAs in luminal and basal-like breast cancer, of which 18 miRNAs were down-regulated and 17 miRNAs were up-regulated compared to luminal breast cancer. Target gene prediction results shows that were 4,180 potential target genes in these 35 differentially expressed miRNAs, among which 19 were the most related, and the corresponding differential miRNAs were miR-199a-5p and miR-199b-5p. Compared with luminal breast cancer, miR-199a-5p and miR-199b-5p were down regulated in basal-like breast cancer. Quantitative real-time PCR results showed that the expression levels of miR-199a-5p and miR-199b-5p in MCF-7 and MDA-MB-468 cells were consistent with the results of GEO2R analysis. The results of survival analysis showed that the low expression of miR-199a-5p and miR-199b-5p was associated with the decreased overall survival rate of patients with luminal A breast cancer. **Conclusion** 35 differentially expressed miRNAs in luminal and basal-like breast cancer were screened. Among them, miR-199a-5p and miR-199b- 5p are related to the prognosis of breast cancer. These miRNAs are expected to become new therapeutic biomarkers.

【Keywords】 miRNAs; Luminal breast cancer; Basal-like breast cancer; Survival analysis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，2020 年世界卫生组织国际癌症研究机构（IARC）最新发布的全球癌症负担数据表明，全球乳腺癌新发病例高达 226 万例，超过了肺癌，成为全球第一大癌^[1-2]。2012 年我国新诊断乳腺癌占全球的 12.2%，死亡病例占全球的 9.6%，该数据源于中国国家癌症登记中心，只有 13% 的中国人口被纳

入，可能低估了我国乳腺癌发病率和死亡率^[3]。美国癌症协会最新的统计显示，乳腺癌发病率以每年 0.3% 的速度缓慢增长，主要为 Luminal 型乳腺癌^[4]。

近年来，人们尝试采用各种高通量分子技术探究乳腺癌的内在本质，根据其分子特征进行分类、治疗及预后评估，其中基因表达谱技术的应

用最受关注。Perou 等于 2000 年首次通过基因表达谱聚类分析方法, 将乳腺癌分为管腔上皮 A 型 (Luminal A)、管腔上皮 B 型 (Luminal B)、HER-2 过表达型、基底样型 (Basal-like) 和正常乳腺样型 (Normal-like) 5 种分子类型。此后, 研究者开发了很多简化模式如 PAM50 和 SCMGENE 等, 来增强分子分型的实用性^[5-7]。2011 年 St.Gallen 专家组达成共识, 采用雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2)、Ki67 四种免疫组化标记来进行乳腺癌分子分型, 将乳腺癌分为 Luminal A 型、Luminal B 型、HER-2 过表达型及三阴性乳腺癌 (TNBC)^[8-9]。之后的临床研究, 证实了它们在预后和治疗反应等方面的特异性, 受到越来越广泛认可。不同的分子分型在乳腺癌的治疗和预后上存在一定的差异, 其中 Luminal A 型乳腺癌预后最好, Luminal B 型次之, Basal-like 型乳腺癌预后最差^[8-9]。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长约 22 个核苷酸组成的非编码单链 RNA 分子, 通过与靶基因 mRNA 互补结合, 从而参与基因表达转录后的调控^[10]。有研究表明, miRNA 的表达水平与乳腺癌的免疫组化、分子分型、预后及治疗反应密切相关^[11]。Shin 等发现 miR-199a-5p 在三阴性乳腺癌组织中表达低于正常乳腺组织^[12]。而 Bockmeyer 等采用聚类分析方法发现, 相较于 Luminal 型乳腺癌, Basal-like 型乳腺癌在 miR-199a-3p 中表达水平明显上调^[13]。在临床上, Basal-like 型乳腺癌较 Luminal 型乳腺癌药物反应性和预后差, 且易侵袭和转移。为了探讨 Luminal 型乳腺癌和 Basal-like 型乳腺癌间是否存在差异 miRNAs 导致这种差别, 本文拟通过生物信息学方法, 系统全面获取和分析 Luminal 型和 Basal-like 型乳腺癌之间差异表达的 miRNAs, 以期能找到在这两类预后相差较大的乳腺癌中最相关的 miRNAs。为以后两类分子分型乳腺癌, 尤其是 Basal-like 型乳腺癌的诊断和治疗方面提供依据。

1 资料与方法

1.1 获取表达谱芯片数据

在美国国立生物技术信息中心 (National

Center for Biotechnology Information, NCBI) GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中, 以 “microRNAs” 和 “breast cancer” 为检索词进行检索, 并按照以下纳入与排除标准进行筛选。纳入标准: ① miRNAs 物种为人类; ② 数据集中必须同时包含 Luminal 型和 Basal-like 型乳腺癌样本; ③ 数据集根据 PAM50 划分乳腺癌的分子分型。不同数据集、相同基因平台时, 取样本量最大最全者。最后共纳入 2 个数据集 GSE81000 与 GSE40267, 分别由芯片平台 GPL10656 与 GPL10850 提供注释信息。筛选并下载 2 个数据集中 Luminal 型和 Basal-like 型的乳腺癌 miRNAs 微阵列数据集, 其中 GSE81000 中 Luminal 型乳腺癌 244 例, Basal-like 型乳腺癌 45 例; GSE40267 中 Luminal 型和 Basal-like 型乳腺癌分别为 20 例和 94 例。

1.2 筛选差异表达的 miRNAs

利用 GEO2R 在线分析工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?>), 分析 Luminal 型和 Basal-like 型 2 组乳腺癌的微阵列数据, 以 $P < 0.05$ 且差异倍数 (fold change, FC) 的绝对值 ≥ 1.5 作为差异表达 miRNAs 的筛选标准。使用 Venn diagram webtool (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 筛选两个数据集共同相交的 miRNAs。两个数据集共同的差异 miRNAs 被视为关键 miRNAs。

1.3 差异表达 miRNAs 的靶基因预测

利用 miRNAs 靶基因预测数据库 mirDIP^[14] (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/index.jsp#r>) 在线预测 2 组乳腺癌差异表达 miRNAs 的潜在靶基因, 并根据 Integrated Score 值 ≥ 0.9 筛选最相关的靶基因。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测差异表达 miRNAs

人乳腺癌细胞系 MCF-7 与 MDA-MB-468 来源于 ATCC, 采用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37℃ 恒温孵箱中培养, 选择处于对数生长期的细胞进行实验。采用 TRIZOL 分别提取 MCF-7 细胞与 MDA-MB-468 细胞的总 RNA。利用反转录试剂盒 (ELK Biotechnology) 生成 cDNA 模板, 再采用 qRT-PCR 试剂盒 (ELK Biotechnology) 检测差异 miRNAs 的相对表达水平, 以 U6 基因的 mRNA 作为内参基因。hsa-miR-199a-5p 正向引物序列 5'-CCCACTGTTTCAGACTACCTGTTTC-3', 反

向引物序列 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTC-3'; hsa-miR-199b-5p 正向引物序列 5'-CCCAGTGT TTAGACTATCTGTTTCCT-3', 反向引物序列 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTC-3'。PCR 扩增条件: 预变性 95℃、3 min; 循环段, 95℃、10s, 58℃、30s, 72℃、30s, 循环 40 次。数据采用 2-ΔΔCT 法进行分析。

1.5 不同分子分型乳腺癌差异表达 miRNAs 的生存分析

利用 METABRIC 数据库 (http://www.cbioportal.org/study/summary?id=brca_metabric), 对 Breast cancer miRNA 中 979 例 Luminal 型乳腺癌组织样本(其中 Luminal A 型 546 例, Luminal B 型 433 例)和 203 例 Basal-like 型乳腺癌组织样本, 在 hsa-miR-199a-5p 和 hsa-miR-199b-5p 中的差异表达进行生存分析。

1.6 统计分析

通过 R 语言的 Pheatmap 包对筛选出来最相关靶基因进行可视化分析。采用 SPSS 20.0 统计学软件处理 PCR 数据, 两组间采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 具有统计学差异。对 METABRIC 数据库中筛选样本采用 Kaplan-Meier Plotter (http://kmplot.com/analysis/index.php?p=service&cancer=breast_mirna) 进行生存分析, 针对所有可能值分组进行 Cox 回归, 将最小 P 值对应的分界值确定为最佳 cut off 值, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果

2.1 差异表达 miRNAs 获取

采用 GEO2R 分析工具, 根据筛选标准, 从数据集 GSE81000 与 GSE40267 中共筛选出 896 条差异 miRNAs, 其中人源 miRNAs 878 条, 最终在两个数据集中筛选出 35 种关键 miRNAs, 详见图 1。相较于 Luminal 型乳腺癌, 有 18 种 miRNAs 在 Basal-like 型患者中表达下调, 而 17 种 miRNAs 表达上调(表 1)。

2.2 差异表达 miRNAs 的靶基因预测

靶基因预测数据库 mirDIP 检索并筛选结果显示, 35 种关键 miRNAs 的潜在靶基因共 4 180 个, 最相关的靶基因有 19 个, 其中 5 个靶基因(SLC24A3、MYRF、PODXL、CELSR1、CAPRN1) 由 miR-199a-5p 与 miR-199b-5p 共同靶向。使用 R 语言 Pheatmap 包进行可视化分析, 结果如图 2 所示。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测差异表达 miRNAs

采用 qRT-PCR 检测人乳腺癌细胞 MCF-7 (Luminal 型) 和 MDA-MB-468 (Basal-like 型) 细胞中 miR-199a-5p 与 miR-199b-5p 的表达水平。与 MCF-7 细胞相比, MDA-MB-468 细胞中 miR-199a-5p 与 miR-199b-5p 表达水平均呈下降趋势, 但差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 不同分子分型乳腺癌生存分析

利用 METABRIC 数据库分析 546 例 Luminal

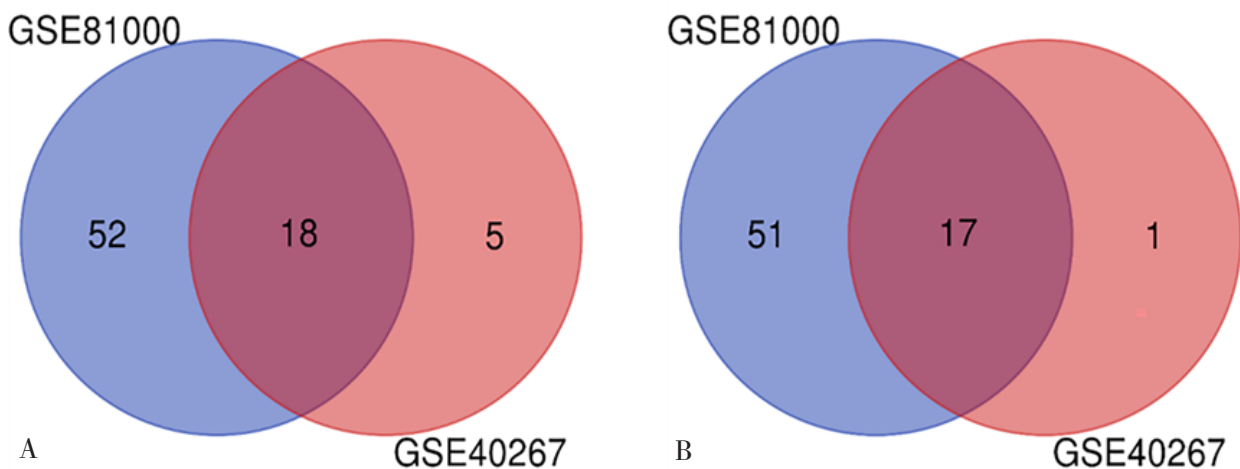


图1 两个数据集差异表达 miRNAs 韦恩图

Figure 1. Venn diagram of differential expression of miRNAs in two data sets

注: A是下调miRNAs, B是上调miRNAs。

A 型、433 例 Luminal B 型及 203 例 Basal-like 型乳腺癌组织样本中 miR-199a-5p 和 miR-199b-5p 的表达水平与患者总体生存率的关系，发现 miR-199a-5p 与 miR-199b-5p 表达水平与不同分子分型乳腺癌的预后具有相关性。在 Luminal 型乳腺癌患者中，miR-199a-5p ($P=0.0031$, cut off 值为 9.26) 与 miR-199b-5p ($P=0.00061$, cut off 值为 9.23) 低表达与 Luminal A 型乳腺癌患者的总生存率降

低相关，具有统计学差异，生存分析结果见图 3A 和图 3B。而在 Luminal B 型乳腺癌中无统计学意义，详见图 3C 和图 3D。尽管在 Basal-like 型乳腺癌患者中，miR-199a-5p 与 miR-199b-5p 表达与其预后相关性无明显统计学差异 ($P > 0.05$)，但在 miR-199a-5p 与 miR-199b-5p 高表达的 Basal-like 型乳腺癌患者总生存率的整体趋势高于低表达的患者，生存曲线见图 3E 和图 3F。

表1 利用GEO2R在线分析工具筛选获得差异表达的关键miRNAs

Table 1. The Key differentially expressed miRNAs were screened by GEO2R online analysis tool

表达变化	miRNAs	Log FC	P值	
上调	hsa-miR-135b	1.384	5.83E-05	
	hsa-miR-19a	1.201	1.56E-06	
	hsa-miR-17	1.061	2.88E-06	
	hsa-miR-20a	1.055	2.13E-03	
	hsa-miR-19b	0.997	1.82E-07	
	hsa-miR-92a	0.941	2.03E-05	
	hsa-miR-18a	0.940	6.80E-07	
	hsa-miR-663	0.828	5.58E-03	
	hsa-miR-146a	0.826	3.65E-03	
	hsa-miR-1290	0.821	1.56E-03	
	hsa-miR-210	0.716	4.65E-02	
	hsa-miR-1246	0.713	2.07E-02	
	hsa-miR-9*	0.712	2.37E-02	
	hsa-miR-224	0.703	4.33E-03	
	hsa-miR-17*	0.643	1.78E-05	
	hsa-miR-630	0.619	1.49E-02	
	hsa-miR-106b	0.601	1.21E-03	
	下调	hsa-miR-193b	-0.606	1.05E-03
		hsa-miR-497	-0.615	6.07E-03
		hsa-miR-26a	-0.618	3.51E-03
hsa-miR-365		-0.619	4.24E-03	
hsa-miR-199b-5p		-0.692	1.42E-02	
hsa-miR-30a*		-0.724	2.38E-04	
hsa-miR-30a		-0.736	4.78E-02	
hsa-miR-199a-5p		-0.760	1.67E-02	
hsa-miR-10b		-0.796	5.69E-04	
hsa-let-7c		-0.889	3.90E-05	
hsa-miR-26b		-0.892	5.58E-03	
hsa-miR-342-5p		-0.910	4.84E-18	
hsa-miR-10a		-0.925	8.25E-04	
hsa-let-7b		-0.963	7.96E-07	
hsa-miR-29c*		-1.028	8.08E-19	
hsa-miR-29c		-1.770	1.44E-14	
hsa-miR-375		-1.834	1.64E-08	
hsa-miR-342-3p		-1.974	2.29E-22	

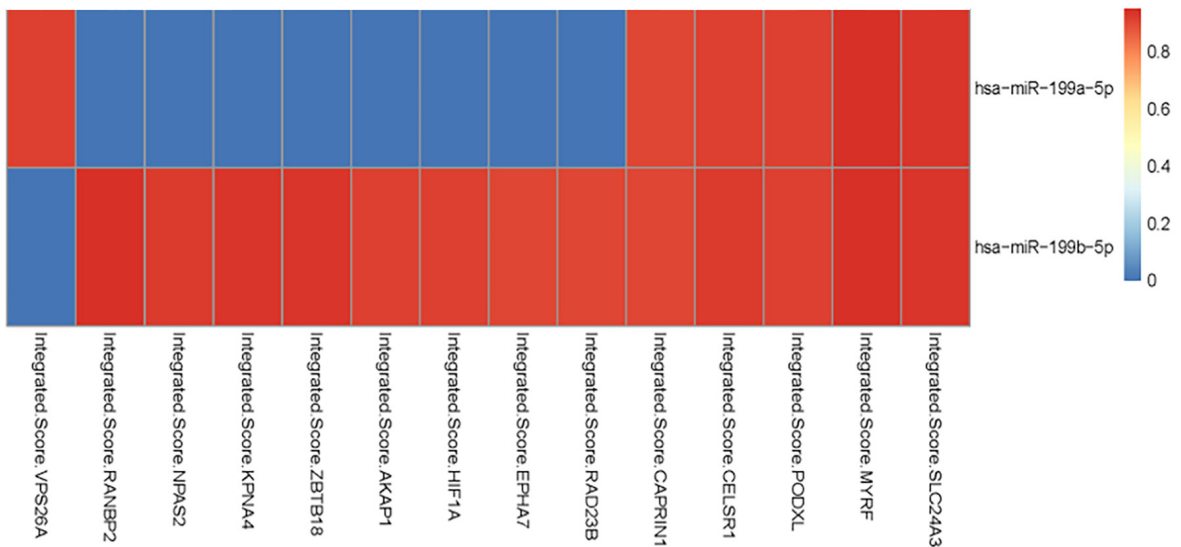


图2 利用靶基因预测数据库mirDIP预测差异表达miRNAs的最相关靶基因结果
Figure 2. The most relevant target genes of predicted differentially expressed miRNAs by target gene prediction database mirDIP

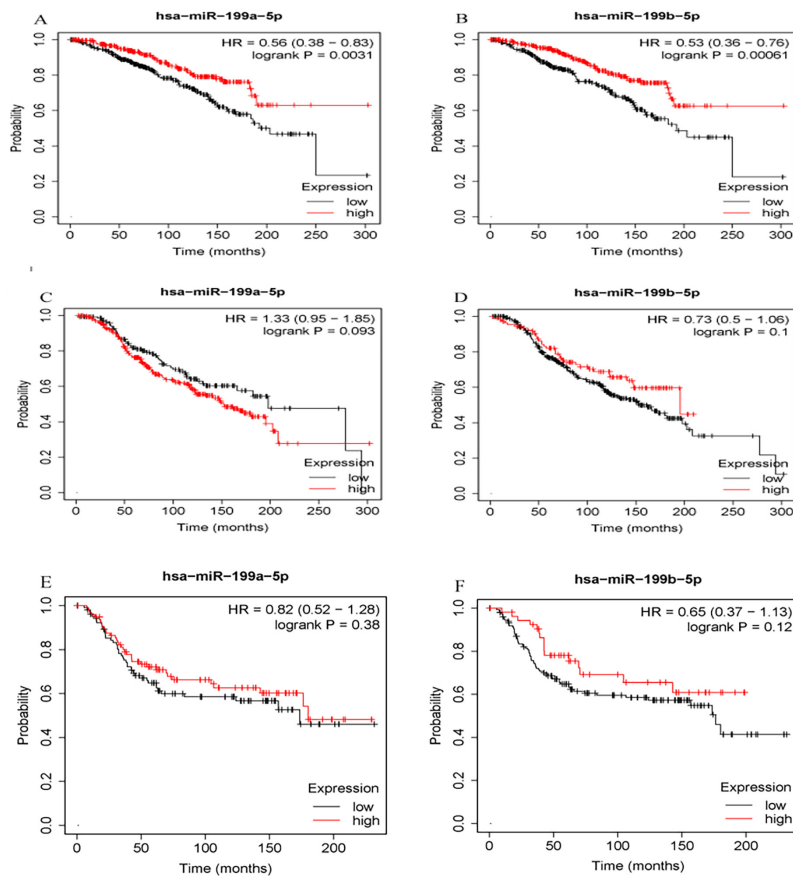


图3 A、C和E分别表示Luminal A型、Luminal B型和Basal-like型乳腺癌在miR-199a-5P中表达水平与预后生存率的关系；图3 B、D和F分别表示Luminal A型、Luminal B型和Basal-like型乳腺癌在miR-199b-5P中表达水平与预后生存率的关系

Figure 3. Kaplan - Meier overall survival analyses for the miR-199a-5p expressed in the (A) Luminal A, (C) Luminal B, (E) Basal-like breast cancer patients, and the miR-199b-5p expressed in the (B) Luminal A, (D) Luminal B, (F) Basal-like breast cancer patients

3 讨论

乳腺癌在分子水平具有高度异质性,不同分子分型的乳腺癌患者对治疗反应各不相同。4种主要分子分型的乳腺癌患者预后存在显著差异,其中 Luminal A 型乳腺癌预后最好, Basal-like 型乳腺癌预后最差。乳腺癌的早期诊断对改善预后至关重要。随着医学技术的发展,分子生物标志物如 ER、PR 和 HER-2,已充分用于诊断和预测肿瘤预后^[15]。但这些生物标志物存在一定局限性,不能从外周血直接获取。

miRNA 可以调控细胞增殖、分化、凋亡、肿瘤微环境、侵袭和迁移,在乳腺癌的发生和发展中具有重要作用^[16-17]。再加上 miRNA 在血液中的稳定性、无创性、特异性和可测量性^[18-19],使其成为乳腺癌诊断、治疗和预后预测理想的生物标志物。不同于以往的小样本研究,本研究整合了来自不同人群的 2 个 miRNA 微阵列数据集,通过生物信息学方法分析 Luminal 型和 Basal-like 型乳腺癌之间差异表达的 miRNAs。最终筛选出 35 种差异表达的关键 miRNAs。其中 18 种 miRNAs 在 Basal-like 型乳腺癌相较于 Luminal 型乳腺癌中表达下调,17 种表达上调。靶基因预测获得潜在靶基因共 4 180 个,最相关的靶基因有 19 个,与其密切相关的 miRNAs 是 miR-199a-5p 和 miR-199b-5p。采用 qRT-PCR 检测其在乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-468 细胞表达水平,结果显示与 MCF-7 细胞相比,MDA-MB-468 细胞在 miR-199a-5p 与 miR-199b-5p 表达水平均呈下降趋势。目前虽然也有研究表明 miR-199a-5p 与 miR-199b-5p 低表达与乳腺癌总生存率显著降低相关,但研究多聚焦在三阴乳腺癌(TNBC)^[20-23]。TNBC 乳腺癌并不等同于 Basal-like 乳腺癌, TNBC 乳腺癌中还包含 20% Non-basal-like 乳腺癌^[24]。因此,miR-199a-5p 和 miR-199b-5p 表达水平与 Basal-like 乳腺癌和 Luminal 乳腺癌预后关系尚未得到评估。本研究侧重于探讨 miR-199a-5p 和 miR-199b-5p 的表达水平与 Basal-like 和 Luminal 型乳腺癌患者预后的关系。生存分析结果显示,miR-199a-5p 与 miR-199b-5p 低表达与 Luminal A 型乳腺癌患者的总生存率降低显著相关。而 Luminal B 型乳腺癌患者预后却与 miR-199a-5p 与 miR-199b-5p 表达水平无关。尽管无统计学差异, Basal-

like 型乳腺癌患者总生存率在 miR-199a-5p 与 miR-199b-5p 低表达时亦呈现降低的趋势。有研究表明,miR-199a-5p 可靶向 Ets-1 (E-Twenty-Six-1) 的 3'-UTR 降低 β 1 整合素水平,从而通过 FAK/Src/Akt/mTOR 信号通路减轻乳腺癌的侵袭^[25]。Lin 等研究发现 miR-199b-5p 具有抗血管生成作用,通过直接靶向激活素受体样激酶 1 (Activin Receptor-Like Kinase 1, ALK1),提示 miR-199b-5p 可能是一个潜在的抗血管生成的乳腺癌治疗靶点^[26]。

总之,本研究通过生物信息学分析,确定了 35 个在 Luminal 型和 Basal-like 型乳腺癌中差异表达的关键 miRNAs,可能在乳腺癌的个体化治疗中发挥重要作用。其中,miR-199a-5p、miR-199b-5p 与 Luminal A 型乳腺癌的预后相关,有望成为其治疗的新靶点。相关 miRNA 在乳腺癌分子分型中的调控机制有待进一步研究。

利益冲突 本研究所有作者均无利益冲突。

参考文献

- 1 Heer E, Harper A, Escandor N, et al. Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study[J]. *Lancet Glob Health*, 2020, 8(8): e1027-e1037. DOI: 10.1016/S2214-109X(20)30215-1.
- 2 International Agency for Research on Cancer. Latest global cancer data: cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020[EB/OL]. [Access on 2020-12-15]. https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2020/12/pr292_E.pdf.
- 3 Fan L, Strasser-Weippl K, Li JJ, et al. Breast cancer in China[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7): e279-e289. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70567-9.
- 4 DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, et al. Breast cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(6): 438-451. DOI: 10.3322/caac.21583.
- 5 Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours[J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 747-752. DOI: 10.1038/35021093.
- 6 Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(8): 1160-1167. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.1370.
- 7 Haibe-Kains B, Desmedt C, Loi S, et al. A three-gene model to robustly identify breast cancer molecular

- subtypes[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2012, 104(4): 311–325. DOI: [10.1093/jnci/djr545](https://doi.org/10.1093/jnci/djr545).
- 8 张力文. 基于分子分型的乳腺癌流行病学研究 [D]. 天津医科大学, 2018. DOI: [10.27366/d.cnki.gtyku.2018.000007](https://doi.org/10.27366/d.cnki.gtyku.2018.000007). [Zhang LW. Epidemiological study of breast cancer based on molecular subtyping[D]. Tianjin medical university, 2018.]
 - 9 李杰宝, 喻晓程, 田野. 乳腺癌分子分型与临床病理参数的关系及预后 [J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(6): 1027–1029. DOI: [10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2018.06.010](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2018.06.010). [Li JB, Yu XC, Tian Y. Correlation between molecular subtypes, clinicopathological parameters and prognosis of breast cancer[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2018, 35(6): 1027–1029.]
 - 10 O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, et al. Overview of Microrna biogenesis, mechanisms of actions, and circulation[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 402. DOI: [10.3389/fendo.2018.00402](https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402).
 - 11 Perri F, Longo F, Giuliano M, et al. Epigenetic control of gene expression: potential implications for cancer treatment[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 111: 166–172. DOI: [10.1016/j.critrevonc.2017.01.020](https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.01.020).
 - 12 Shin VY, Siu JM, Cheuk I, et al. Circulating cell-free miRNAs as biomarker for triple-negative breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(11): 1751–1759. DOI: [10.1038/bjc.2015.143](https://doi.org/10.1038/bjc.2015.143).
 - 13 Bockmeyer CL, Christgen M, Müller M, et al. MicroRNA profiles of healthy basal and luminal mammary epithelial cells are distinct and reflected in different breast cancer subtypes[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 130(3): 735–745. DOI: [10.1007/s10549-010-1303-3](https://doi.org/10.1007/s10549-010-1303-3).
 - 14 Tokar T, Pastrello C, Rossos AE, et al. mirDIP 4.1-integrative database of human microRNA target predictions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(1): 360–370. DOI: [10.1093/nar/gkx1144](https://doi.org/10.1093/nar/gkx1144).
 - 15 Wesseling J, Tinterri C, Sapino A, et al. An international study comparing conventional versus mRNA level testing (Target Print) for ER, PR, and HER2 status of breast cancer[J]. *Virchows Arch*, 2016, 469(3): 297–304. DOI: [10.1007/s00428-016-1979-9](https://doi.org/10.1007/s00428-016-1979-9).
 - 16 Li L, Xiao B, Tong H, et al. Regulation of breast cancer tumorigenesis and metastasis by miRNAs[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2012, 9(6): 615–625. DOI: [10.1586/ep.12.64](https://doi.org/10.1586/ep.12.64).
 - 17 王维君, 何科基, 那光玮, 等. microRNA 的生物学功能及其在乳腺癌发生发展中的作用 [J]. *甘肃医药*, 2020, 39(5): 389–391. DOI: [10.15975/j.cnki.gsyy.2020.05.002](https://doi.org/10.15975/j.cnki.gsyy.2020.05.002). [Wang WJ, He KJ, Na GW, et al. Biological function of microRNA and its role in the development of breast cancer[J]. *Gansu Medical Journal*, 2020, 39(5): 389–391.]
 - 18 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(30): 10513–10518. DOI: [10.1073/pnas.0804549105](https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105).
 - 19 Nassar FJ, Nasr R, Talhouk R. MicroRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis, prognosis and therapy prediction[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 172: 34–49. DOI: [10.1016/j.pharmthera.2016.11.012](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.11.012).
 - 20 翟丽敏, 杨硕, 李文通. miRNA-199a-5p 通过 SP1 调节 ERK5 抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭的机制 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2015, 31(9): 981–985. DOI: [10.13315/j.cnki.cjcep.2015.09.005](https://doi.org/10.13315/j.cnki.cjcep.2015.09.005). [Zhai LM, Yang S, Li WT. miRNA-199a-5p inhibit the invasion of MDA-MB-231 cells via regulating ERK5 through SP1 [J]. *J Clin Exp Pathol*, 2015, 31(9): 981–985.]
 - 21 Turashvili G, Lightbody ED, Tyryshkin K, et al. Novel prognostic and predictive microRNA targets for triple-negative breast cancer[J]. *FASEB J*, 2018, 32: 1–18. DOI: [10.1096/fj.201800120R](https://doi.org/10.1096/fj.201800120R).
 - 22 Wu A, Chen Y, Liu Y, et al. miR-199b-5p inhibits triple negative breast cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting DDR1[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(4): 4889–4896. DOI: [10.3892/ol.2018.9255](https://doi.org/10.3892/ol.2018.9255).
 - 23 Fang C, Wang FB, Li Y, et al. Down-regulation of miR-199b-5p is correlated with poor prognosis for breast cancer patients[J]. *Biomed Pharmacotherapy*, 2016, 84: 1189–1193. DOI: [10.1016/j.biopha.2016.10.006](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.006).
 - 24 Temian DC, Pop LA, Irimie AI, et al. The epigenetics of triple-negative and basal-like breast cancer: current knowledge[J]. *J Breast Cancer*, 2018, 21(3): 233–243. DOI: [10.4048/jbc.2018.21.e41](https://doi.org/10.4048/jbc.2018.21.e41).
 - 25 Li W, Wang H, Zhang J, et al. miR-199a-5p regulates β 1 integrin through Ets-1 to suppress invasion in breast cancer[J]. *Cancer Sci*. 2016, 107(7): 916–923. DOI: [10.1111/cas.12952](https://doi.org/10.1111/cas.12952).
 - 26 Lin X, Qiu W, Xiao Y, et al. MiR-199b-5p suppresses tumor angiogenesis mediated by vascular endothelial cells in breast cancer by targeting ALK1[J]. *Front Genet*, 2020, 10: 1397. DOI: [10.3389/fgene.2019.01397](https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01397).
- 收稿日期: 2021 年 01 月 28 日 修回日期: 2021 年 03 月 04 日
 本文编辑: 桂裕亮 黄笛